



PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of

Takahiko ISHIGURO, et al.

Appln. No.: 09/904,557

Group Art Unit: Not yet assigned

Confirmation No.: Not yet assigned

Examiner: Not yet assigned

Filed: July 16, 2001

For: NOVEL GENOME ANALYZING METHOD

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Submitted herewith are certified copies of the priority documents on which a claim to priority was made under 35 U.S.C. § 119. The Examiner is respectfully requested to acknowledge receipt of said priority documents.

Respectfully submitted,

SUGHRUE MION, PLLC
2100 Pennsylvania Avenue, N.W.
Washington, D.C. 20037-3213
Telephone: (202) 293-7060
Facsimile: (202) 293-7860

for John Callahan Reg. No. 32,607
Mark Boland
Registration No. 32,197

Enclosures: Japan 2000-218737
Japan 2000-263248
Japan 2000-334935

Date: May 31, 2002



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年10月30日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-334935

出 願 人

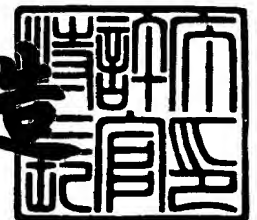
Applicant(s):

東ソー株式会社

2001年 7月 3日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3062227

【書類名】 特許願
 【整理番号】 PA211-0313
 【提出日】 平成12年10月30日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 G01N 33/58
 【発明の名称】 新規ゲノム解析法
 【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市港北区岸根町4 9 0 - 1 7

【氏名】 石黒 敬彦

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市麻生区上麻生3 - 2 2 - 1 1 - 1 0 7

【氏名】 保川 清

【特許出願人】

【識別番号】 000003300

【氏名又は名称】 東ソー株式会社

【代表者】 田代 圓

【電話番号】 (03)-5427-5134

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2000-218737

【出願日】 平成12年 7月14日

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2000-263248

【出願日】 平成12年 8月28日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003610

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】新規ゲノム解析法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】任意生物種のゲノム中に存在する、連続した任意の DNA 配列であって、塩基配列は既知であるが遺伝子発現部位であるか否か不明である DNA 配列（特定領域）について、前記生物種由来の RNA 中に該領域の塩基配列に対応する塩基配列が存在するか否かを検出することにより、該特定領域が遺伝子発現部位であるか否かを決定する方法。

【請求項 2】前記特定領域は、100～200 塩基の DNA 領域であることを特徴とする請求項 1 の方法。

【請求項 3】前記検出は、前記特定領域中の 5' 端に位置する、連続した少なくとも 10 塩基以上から成る配列と相同なオリゴヌクレオチド、及び、前記特定領域中の 3' 端に位置する、連続した少なくとも 10 塩基以上から成る配列と相補的なオリゴヌクレオチド、を用い、前記生物種由来である RNA に基づく DNA 又は RNA の増幅操作により、DNA 又は RNA が増幅されたか否かを検出することからなる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】前記増幅は RNA の増幅であり、前記オリゴヌクレオチドであって、いずれか一方はその 5' 端に RNA を転写可能なプロモーター配列を有するオリゴヌクレオチドを用い、（1）RNA 依存性 DNA ポリメラーゼにより、前記生物種由来である RNA を鋳型として、前記一方のオリゴヌクレオチドから前記生物種由来の RNA の一部に相補的な DNA を合成し、その結果 RNA-DNA ハイブリッドが生成され、（2）リボヌクレエース H によって前記 RNA-DNA ハイブリッドの前記生物種由来である RNA を分解して 1 本鎖 DNA が生成され、（3）DNA 依存性 DNA ポリメラーゼにより、前記 1 本鎖 DNA を鋳型として、前記他方のオリゴヌクレオチドから前記 1 本鎖 DNA に相補的な DNA が合成され、その結果前記生物種由来の RNA の一部である RNA 又はその一部に相補的な RNA を転写可能なプロモーター配列を有する 2 本鎖 DNA が生成され、（4）RNA ポリメラーゼにより、前記 2 本鎖 DNA から RNA 転写産物が生成され、そして（5）該 RNA 転写産物を鋳型として前記（1）から（4）が

繰り返される、とのRNA増幅であることを特徴とする、請求項3に記載の方法。

【請求項5】前記DNA又はRNAが増幅されたか否かの検出は、前記増幅を、増幅により生成されるDNA又はRNAと特異的に結合可能であり、かつ、インターカレーター性蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドプローブ（ただし該オリゴヌクレオチドは前記オリゴヌクレオチドのいずれとも相補結合を形成しない配列である）存在下で実施し、反応液の蛍光特性の変化を測定することによって行うことを特徴とする、請求項3又は4に記載の方法。

【請求項6】前記プローブは、増幅により生じるDNA転写産物又はRNA転写産物の少なくとも一部の配列と相補結合し、複合体を形成していない場合と比較して蛍光特性が変化するものであることを特徴とする請求項5に記載の検出方法。

【請求項7】請求項1～6に記載の方法を繰り返し行うことによる、ゲノム上の任意の領域あるいはゲノム全体を対象とした遺伝子発現部位決定法。

【請求項8】請求項1～7に記載の方法により遺伝子発現部位であることが決定された、ゲノム中の遺伝子。

【請求項9】請求項8の遺伝子がコードする蛋白質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本願発明は、塩基配列は既知であるが遺伝子発現部位であるか否か不明であるDNA配列（特定領域）に対する遺伝子発現部位決定法、及び、それを繰り返し行うことによるゲノム上の任意の領域あるいはゲノム全体を対象とした遺伝子発現部位決定法に関するものである。また本願発明は、かかる方法に基づいて遺伝子発現部位であることが決定されたゲノム中の遺伝子及び該遺伝子がコードする蛋白質に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

30億塩基から成るヒトゲノムを含め、各生物種のゲノムの塩基配列が明らか

になりつつあるとともに、いわゆるポストゲノムが展開されている。ポストゲノムの目標は、生物が一生にわたって生成するすべての蛋白質の種類と活性を理解することである。更に、ヒトのポストゲノムの主要な目標は、遺伝子機能解析に基づく新規医薬の開発（ゲノム創薬）やテーラーメイド医療の基盤確立である（DeRisiら、Science、278巻、680頁、1997年参照）。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

ポストゲノムにおいて、特にRNAの発現様式はトランスクリプトームと呼ばれている。トランスクリプトーム解析において、ゲノム上の全遺伝子を同定することは重要な問題である。ゲノムのDNA配列が明らかになったからといって、遺伝子は同定されない。

【0004】

ヒトゲノム上の遺伝子はおよそ10万と推定されているが、現在までのところ明らかになったものは6千に過ぎない。残りの遺伝子の中に重要な役割をもつものがあつたとしても、これらを同定することは困難である。

【0005】

(1) 例えば、2次元電気泳動においては、希少な蛋白質は大量に存在するハウスキーピング蛋白質の中に容易に紛れ込み、見分けることは実際上不可能である。またcDNAライブラリーの解析においても同様で、希少なcDNAが選択され、塩基配列決定に供されることは確率的に極めて低い。しかも、これらの方法では、全遺伝子の同定を目標とした場合の、現時点での到達度を知ることはできない。

【0006】

(2) 例えば、マイクロアレイは、数千種のcDNAを結合したチップを用いて同定を行おうとするものであるが、結合されたcDNAはすでに同定されたものだけであるから、従来知られていない新たな遺伝子が同定されることはない。

【0007】

(3) また例えば、コンピューターにより新たに遺伝子を同定する試みも報告され（Borkら、Nature Genet.、18巻、313頁、1998

年参照)、これを行うためのプログラムとしてGRAIL、HEXON、GENSCAN等が提供されている。しかし、トランスクリプトーム解析では、予想ではなく実験データに基づく遺伝子の同定が強く望まれることは言うまでもない。

【0008】

そこで本願発明の目的は、新規トランスクリプトーム解析法を提供するとともに、かかる方法によって見出される遺伝子や該遺伝子がコードする蛋白質を提供しようとするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するためになされた本願請求項1の発明は、任意生物種のゲノム中に存在する、連続した任意のDNA配列であって、塩基配列は既知であるが遺伝子発現部位であるか否か不明であるDNA配列(特定領域)について、前記生物種由来のRNA中に該領域の塩基配列に対応する塩基配列が存在するか否かを検出することにより、該特定領域が遺伝子発現部位であるか否かを決定する方法である。本願請求項2の発明は、請求項1の発明に関し、前記特定領域が100～200塩基のDNA領域であることを特徴とする。

【0010】

本願請求項3の発明は、前記請求項1又は2の発明に関し、前記検出が、前記特定領域中の5'端に位置する、連続した少なくとも10塩基以上から成る配列と相同なオリゴヌクレオチド、及び、前記特定領域中の3'端に位置する、連続した少なくとも10塩基以上から成る配列と相補的なオリゴヌクレオチド、を用い、前記生物種由来であるRNAに基づくDNA又はRNAの増幅操作により、DNA又はRNAが増幅されたか否かを検出することからなる。本願請求項4の発明は、前記請求項3又は4の発明に関し、前記増幅がRNAの増幅であり、前記オリゴヌクレオチドであって、いずれか一方はその5'端にRNAを転写可能なプロモーター配列を有するオリゴヌクレオチドを用い、(1)RNA依存性DNAポリメラーゼにより、前記生物種由来であるRNAを鋳型として、前記一方のオリゴヌクレオチドから前記生物種由来のRNAの一部に相補的なDNAを合成し、その結果RNA-DNAハイブリッドが生成され、(2)リボヌクレエー

スHによって前記RNA-DNAハイブリッドの前記生物種由来であるRNAを分解して1本鎖DNAが生成され、(3) DNA依存性DNAポリメラーゼにより、前記1本鎖DNAを鋳型として、前記他方のオリゴヌクレオチドから前記1本鎖DNAに相補的なDNAが合成され、その結果前記生物種由来のRNAの一部であるRNA又はその一部に相補的なRNAを転写可能なプロモーター配列を有する2本鎖DNAが生成され、(4) RNAポリメラーゼにより、前記2本鎖DNAからRNA転写産物が生成され、そして(5) 該RNA転写産物を鋳型として前記(1)から(4)が繰り返される、とのRNA増幅であることを特徴とする。

【0011】

本願請求項5の発明は、前記請求項3又は4の発明に関し、前記DNA又はRNAが増幅されたか否かの検出が、前記増幅を、増幅により生成されるDNA又はRNAと特異的に結合可能であり、かつ、インターカレーター性蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドプローブ（ただし該オリゴヌクレオチドは前記オリゴヌクレオチドのいずれとも相補結合を形成しない配列である）存在下で実施し、反応液の蛍光特性の変化を測定することによって行うことを特徴とする。本願請求項6の発明は、前記請求項5の発明に関し、前記プローブが増幅により生じるDNA転写産物又はRNA転写産物の少なくとも一部の配列と相補結合し、複合体を形成していない場合と比較して蛍光特性が変化するものであることを特徴とする。

【0012】

本願請求項7の発明は、前記請求項1～6の発明を繰り返し行うことによる、ゲノム上の任意の領域あるいはゲノム全体を対象とした遺伝子発現部位決定法である。本願請求項8の発明は、前記請求項1～7の発明により遺伝子発現部位であることが決定された、ゲノム中の遺伝子である。そして本願請求項9の発明は、請求項8の遺伝子がコードする蛋白質である。以下、本願発明を詳細に説明する。

【0013】

本願発明の方法は、任意生物種のゲノム中に存在する、連続した任意のDNA

配列であって、塩基配列は既知であるが遺伝子発現部位であるか否か不明である DNA 配列（特定領域）に適用される。かかる特定領域は、公開されているゲノムの DNA 配列から選択し、設定することができる。

【 0 0 1 4 】

前記特定領域の長さは特に制限されないが、200塩基以下、特に100～200塩基の範囲が好ましい。本願発明の方法では、任意に設定した特定領域全体がひとつのエキソンに含まれる場合のみ、該特定領域が遺伝子発現部位であるか否かを決定することが可能である。遺伝子上のエキシンの数や各エキソンの長さは、遺伝子の種類によって大きく異なるが、終止コドンとポリA連結シグナルを含むエキソンはどの遺伝子にもひとつあり、通常、他のエキソンよりも長く、400塩基対を超える。従って、任意のゲノム領域を200塩基対以下の特定領域に断片化すれば、少なくともひとつの断片はエキソンに含まれるため、見落とすことがないのである。

【 0 0 1 5 】

本願発明では、ゲノム上に存在する、連続した任意の DNA 配列を特定領域として以下のような検出を実施するものであるが、ゲノム上の任意の領域又はゲノム全体を断片化し、各断片を特定領域として検出を繰り返せば、当該任意の領域あるいはゲノム全体について、遺伝子発現部位を決定することができる。

【 0 0 1 6 】

本願発明は、同一生物種由来の RNA 中に、前記特定領域の塩基配列に対応する塩基配列が存在するか否かを検出することにより、該特定領域が遺伝子発現部位であるか否かを決定するものである。本願発明に用いる RNA は mRNA であり、遺伝子発現部位を決定しようとするゲノムと同一の生物種由来のものをを用いる。特に前記ゲノムが高等生物のゲノムである場合には、多種類の、好ましくは全組織由来の mRNA を用いることが好ましい。この場合、mRNA は組織ごとに個別に用いてもよいし、混合して用いてもよい。後者において遺伝子発現部位であることがわかった場合は、その後に mRNA を組織ごとの mRNA を用いて個別に用いれば、遺伝子発現部位であることが決定されたゲノム中の遺伝子が、どの組織で発現しているかを知ることができる。mRNA を混合することが可能

な理由は以下の通りである。mRNAの平均分子量を300,000とすると、1 ngのmRNAは 2×10^9 個のmRNAを含む。すると、1000種類の組織のうち1種類においてのみ発現する遺伝子で、その発現量が該組織中のmRNAの10万分の1という割合であっても、該組織を含む1000種類の組織からそれぞれ得られたmRNAの等量混合物1 μ g中には 2×10^4 コピー存在することになる。このコピー数は、後の実施例に示すように、十分検出可能である。

【0017】

前記検出には種々の方法が適用可能である。例えばハイブリダイゼーション法や核酸増幅法を適用することが例示できる。増幅法を用いる場合には、DNA増幅であれ、RNA増幅であれ、特定領域に基づいてデザインされた少なくとも2種類のオリゴヌクレオチド（プライマー）を用いることになるが、一方は特定領域中の5' 端に位置する、連続した少なくとも10塩基以上から成る配列と相同なオリゴヌクレオチドであり、他方は特定領域中の3' 端に位置する、連続した少なくとも10塩基以上から成る配列と相補的なオリゴヌクレオチドである。10塩基以上のオリゴヌクレオチドを使用するのは、オリゴヌクレオチドの特定領域への結合に関して特異性を維持するためである。

【0018】

核酸増幅法としては、プライマーと逆転写酵素を用いて前記mRNAからcDNAを合成した後に、プライマーとDNAポリメラーゼを用いてDNAを鋳型とするプライマーの伸長反応によりDNA（特定領域からなるDNA）を増幅するRT-PCRに代表されるDNA増幅法や、プライマーと逆転写酵素を用いて前記mRNAを鋳型として該RNAに相補的なcDNAを合成した後に、該DNAに相補的な部分を有するプロモーター・プライマーと結合させ、DNAの伸長反応を行い、こうして合成された2本鎖DNAにRNAポリメラーゼを作用させてRNA（特定領域からなるRNA）を大量に合成するRNA増幅がある。前者は既に広く一般に知られた方法であり、後者としては例えばNASBA（Nucleic Acid Sequence Based Amplification）法、3SR法、後述する実施例の方法が例示できる。

【 0 0 1 9 】

N A S B A 法や実施例に記載した方法の概略を説明すれば、前記オリゴヌクレオチドであって、いずれか一方はその 5' 端に RNA を転写可能なプロモーター配列を有するオリゴヌクレオチドを用い、(1) RNA 依存性 DNA ポリメラーゼにより、前記生物種由来である RNA を鋳型として、前記一方のオリゴヌクレオチドから前記生物種由来の RNA の一部に相補的な DNA を合成し、その結果 RNA-DNA ハイブリッドが生成され、(2) リボヌクレエース H によって前記 RNA-DNA ハイブリッドの前記生物種由来である RNA を分解して 1 本鎖 DNA が生成され、(3) DNA 依存性 DNA ポリメラーゼにより、前記 1 本鎖 DNA を鋳型として、前記他方のオリゴヌクレオチドから前記 1 本鎖 DNA に相補的な DNA が合成され、その結果前記生物種由来の RNA の一部である RNA 又はその一部に相補的な RNA を転写可能なプロモーター配列を有する 2 本鎖 DNA が生成され、(4) RNA ポリメラーゼにより、前記 2 本鎖 DNA から RNA 転写産物が生成され、そして(5) 該 RNA 転写産物を鋳型として前記(1)から(4)が繰り返される、との RNA 増幅である。

【 0 0 2 0 】

実施例に記載した方法は、10分というきわめて短時間で増幅が完了するため、短時間内に本願発明の決定が可能であること、特定領域を含む数 pg の RNA をも増幅し得るといふ、高感度であること、そして RNA に混入し得る DNA の影響を排除し得る、という観点から、特に好ましい検出法として例示できる。

【 0 0 2 1 】

以上の増幅で生成される DNA や RNA は、電気泳動等の既知の検出方法で検出することができるが、特に好ましくは、増幅により生成される DNA 又は RNA と特異的に結合可能であり、かつ、インターカレーター性蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドプローブ存在下で前記増幅を実施し、反応液の蛍光特性の変化を測定することである。このプローブは、当然ながら増幅に使用するオリゴヌクレオチドと相補結合を形成しない配列である。このオリゴヌクレオチドプローブとしては、オリゴヌクレオチドのリンにリンカーを介して、インターカレーター性蛍光色素を結合させたもの等を例示できる。この好適なプローブでは、生

成されたDNA又はRNA、即ち特定領域（又は特定領域と相補的な配列）と相補結合して2本鎖を形成するとインターカレーター性蛍光色素がこの2本鎖部分にインターカレートして蛍光特性が変化するため、相補結合を形成しなかったプローブを分離する必要がない（Ishiguro, T. ら、（1996）Nucleic Acids Res. 24（24）4992-4997）。

【0022】

前記オリゴヌクレオチドプローブの塩基配列は、生成されるDNA又はRNAと相補結合可能な配列を有すれば特に限定されないが、生成されたDNA又はRNAへの結合に関する特異性を維持するため、該DNA又はRNA中に存在する、連続した少なくとも10塩基と相補的な10塩基程度のものが好ましい。なお、オリゴヌクレオチドプローブ存在下で増幅を行う場合には、当該プローブをプライマーとした伸長反応を抑えるために、プローブの3'末端の水酸基を化学的に修飾（例えばグリコール酸付加）することが好ましい。

【0023】

特に上記したように、オリゴヌクレオチドプローブ共存下で増幅を行うことにより、本願発明における検出の操作を、一反応容器内、一定温度、一段階で実施することが可能となり、自動化への適用も容易である。

【0024】

本願発明の、遺伝子発現部位決定法を繰り返し行うことによるゲノム解析法の詳細は以下の通りであるが、ゲノム配列が決定されていれば、どの生物種にも適用可能である。該生物種のゲノムを、例えば200塩基対ごとの特定領域に区分する。検出方法として核酸増幅を利用する場合には、各特定領域を増幅するのに必要な2種類のオリゴヌクレオチドを含む、必要なプライマーセットを準備する。なお、必要なプライマーの数やその配列は用いる核酸増幅法により異なる。また、過去の研究において遺伝子発現部位であることがわかっている領域に存在する特定領域や、そのDNA配列から遺伝子発現部位でありえないことが明白な領域に存在する特定領域は対象から外すことは、作業の効率を高めるために有効である。次に、前述のRNAに対し、特定領域毎のプライマーセットを用いて検出を行う。

【0025】

本願発明の方法によりゲノムを解析すれば、その生物種のすべての遺伝子を同定することもできる。また更には、遺伝子発現部位と決定された遺伝子を単離し、該遺伝子がコードする蛋白質を決定したり、該蛋白質を前記単離したDNAを利用して製造することが可能となる。例えば、本願発明の方法により増幅した核酸をプローブとして用い、常法により完全長のcDNAを単離し、塩基配列を決定することが例示できる。これにより、該遺伝子発現部位についてのイントロンやエキソンの関係を含むゲノム構造が解明される。これとは別に、前記増幅された核酸をプローブとして用い、常法によりcDNAライブラリーをスクリーニングし、cDNAを単離すれば、該遺伝子がコードする蛋白質を知ることができる。また更にこの蛋白質を発現させる場合は、常法により、微生物や動物細胞を宿主として、前記cDNAを用いて組換え体を調製し、発現させればよい。

【0026】

【発明の実施の形態】

以下に、発明を更に詳細に説明するために実施例を示すが、本願発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0027】

実施例1 領域の設定

本願発明で提供される遺伝子発現部位決定法の実現可能性を示すために、以下のモデル実験を行った。

【0028】

ゲノム上の領域として、遺伝子工学的に形質転換されたメタノール資化性酵母の株で、本発明者らにより特願平11-188650号に記載された方法で樹立したG1株由来の900塩基対から成る領域を選んだ。G1株は、メタノールによる誘導を受けると、397アミノ酸残基の1本のポリペプチド鎖から成るヒトIL-6R・IL-6融合蛋白質（特願平11-188650号参照）を発現する。

【0029】

図1に示すように、該900塩基対から成る領域を180塩基対から成る5つ

の特定領域に区分した。また、図2には特願平11-188650から既に明らかである、該領域のmRNAの発現様式を示した。図1、図2から明らかなように、特定領域1（塩基番号1～180）は非転写領域159塩基対と転写領域21塩基対を含む。特定領域2（塩基番号181～360）、特定領域3（塩基番号361～540）、特定領域4（塩基番号541～720）、特定領域5（塩基番号721～900）はいずれも転写領域のみを含む。

【0030】

上記5つの特定領域それぞれに対し、図1及び配列番号1～15で示されるオリゴヌクレオチド（プライマー）セット（フォワードプライマー；F、リバープライマー；R、シザープローブ；S）を合成した。DNA増幅（RT-PCR）を行う場合には、このうち、フォワードプライマーとリバープライマーを使用した。また、RNA増幅（TRC；Transcription Reverse transcription Concerting amplification；転写逆転写協奏増幅反応と略す）を行う場合には、フォワードプライマー、リバープライマー、及びシザープローブを使用した。TRCでは、特定領域がmRNAの5' 側に位置していないとこれを増幅できない。シザープローブは、かかる場合に特定領域の5' 側に相補結合し、リボヌクレアーゼの働きにより相補結合部分を切断することによって特定領域がmRNAの5' 側に位置するためのオリゴヌクレオチド（DNA）である。

【0031】

実施例2 mRNAの調製

以下の方法でG1株のmRNAを調製した。

【0032】

3mlのBMGY（Bacto Yeast Extract 10g/l、BactoPeptone 20g/l、Yeast Nitrogen Base without amino acids 1.34g/l、100mMリン酸カリウム緩衝液pH6.0、グリセロール10g/l、ビオチン0.4mg/l）培地に接種し、浸透培養器にて28℃で24時間前培養を行った。

【0033】

3mlのBMGY (Bacto Yeast Extract 15g/l、BactoPeptone 30g/l、その他は上記BMGYと同一組成) 培地に前記培養液100 μ lを接種し、28℃で16時間培養を行った。

【0034】

メタノールの枯渇を確認後、培地にメタノールを100 μ l添加し、ヒトIL-6R・IL-6融合蛋白質の発現を誘導した。メタノール添加2時間後に細胞を集め、 5×10^7 個を直ぐに液体窒素で凍結した。

【0035】

これを、市販のキット (Yeast cell lysis preparation kit、BIO 01 Inc. 社製) で細胞壁を溶解した。次に、市販のキット (QuickPrep mRNA Purification Kit、アマシャムファルマシア社製) を用いてmRNAを調製した。

【0036】

実施例3 DNA増幅による遺伝子発現部位の決定

実施例2で得られたmRNAを用いて、DNA増幅が遺伝子発現部位のみから成る領域由来のプライマーに特異的であるかどうかを調べた。

【0037】

RT-PCRは市販のキット (RT-PCR beads、アマシャムファルマシア社製) を用いた。

【0038】

すなわち、mRNA 200ngからオリゴdTをプライマーとして42℃15分間の反応でcDNAを合成した。次に、フォワードプライマーとリバースプライマーを用いてPCR反応を行った。サーマルサイクラーを用い、約3時間をかけて95℃1分、55℃1分、72℃2分から成るサイクルを30サイクル反応させた。反応後、直ちに4%アガロースで電気泳動を行い、サイバーグリーンで染色した。

【0039】

図3から明らかなように、特定領域1由来のプライマーでは増幅は見られなか

ったが、特定領域 2 ～ 5 由来のプライマーではいずれも増幅が見られた。

【 0 0 4 0 】

以上の結果は、DNA 増幅が、遺伝子発現部位のみから成る特定領域に対するプライマーに特異的であること、すなわち、任意生物種のゲノム中に存在する、連続した任意の DNA 配列であって、塩基配列は既知であるが遺伝子発現部位であるか否か不明である DNA 配列（特定領域）について、前記生物種由来の RNA 中に該領域の塩基配列に対応する塩基配列が存在するか否かを RT-PCR に代表される DNA 増幅によって検出することにより、遺伝子発現部位であるか否かを決定できることを示す。

【 0 0 4 1 】

実施例 4 RNA 増幅法による遺伝子発現部位の決定

実施例 2 で得られた mRNA を用いて、RNA 増幅が遺伝子発現部位のみから成る特定領域由来のプライマーに特異的であるかどうかを調べた。

【 0 0 4 2 】

(1) RNA 希釈液 (10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA) を用い、200 ng / 5 μ l となるよう希釈した。

【 0 0 4 3 】

(2) 以下の組成の反応液 20.8 μ l を 0.5 ml 容のチューブに分注し、これに上記 RNA 試料 5 μ l を添加した。

【 0 0 4 4 】

反応液の組成（各濃度は最終反応液量 30 μ l における濃度）

60 mM Tris-HCl (pH 8.6)、

13 mM MgCl₂,

90 mM KCl、

39 U RNase Inhibitor、

1 mM DTT、

各 0.25 mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP、

3.6 mM ITP、

各 3.0 mM ATP、CTP、GTP、TTP、

0.16 μ M シザープローブ、
1 μ M フォアードプライマー、
1 μ M リバースプライマー、
13% DMSO、
容量調整用蒸留水。

【0045】

(3) この反応液を65℃で15分間保温し、次に41℃で5分間保温した後、
以下の組成の酵素液4.2 μ lを添加した。

【0046】

酵素液の組成（各濃度は最終反応液量30 μ lにおける濃度）

1. 7%ソルビトール、
3 μ g 牛血清アルブミン、
142 U T7 RNAポリメラーゼ（ギブコ社製）、
8 U AMV逆転写酵素（宝酒造（株）製）、
容量調整用蒸留水。

【0047】

(4) 引き続きチューブを41℃で10分、20分、あるいは30分保温した。
反応後、直ちに4%アガロースで電気泳動を行い、サイバーグリーンで染色した

【0048】

図4から明らかなように、10分間の反応（図4 a）、20分間の反応（図4 b）、30分間の反応（図4 c）のいずれにおいても、特定領域1に対するプライマーを用いた場合は増幅は見られなかったが、特定領域2～5に対するプライマーを用いた場合はいずれも増幅が見られた。

【0049】

以上の結果は、RNA増幅が遺伝子発現部位のみから成る領域由来のプライマーに特異的であること、すなわち、任意生物種のゲノム中に存在する、連続した任意のDNA配列であって、塩基配列は既知であるが遺伝子発現部位であるか否か不明であるDNA配列（特定領域）について、前記生物種由来のRNA中に該

領域の塩基配列に対応する塩基配列が存在するか否かを前記したTRCに代表されるRNA増幅によって検出することにより、遺伝子発現部位であるか否かを決定できることを示す。

【0050】

また、実施例3で示したRT-PCRによる増幅がサーマルサイクラーを使用した場合で3時間を要したのに対し、TRCによる増幅は10分でも十分であった。

【0051】

実施例5 インターカレーター性蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドプローブによる測定

実施例2で得られたmRNAを用いて、インターカレーター性蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドプローブによる測定を行った。

【0052】

(1) RNA希釈液(10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA)を用い、200ng/5 μ lとなるよう希釈した。

【0053】

(2) 以下の組成の反応液20.8 μ lを0.5ml容のチューブに分注し、これに上記RNA試料5 μ lを添加した。

【0054】

反応液の組成(各濃度は最終反応液量30 μ lにおける濃度)

60mM Tris-HCl (pH8.6)、

13mM MgCl₂、

90mM KCl、

39U RNase Inhibitor、

1mM DTT、

各0.25mM dATP、dCTP、dGTP、dTTP、

3.6mM ITP、

各3.0mM ATP、CTP、GTP、TTP、

0.16 μ M シザープローブ(3S、配列番号9、3'末端の水酸

基はアミノ化されている)、

1 μ M フォアードプライマー (3 F、配列番号 7)、

1 μ M リバースプライマー (3 R、配列番号 8)、

25 nM のインターカレーター性蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチド (Y O - 3、配列番号 16、5' 末端から 6 番目の「T」と 7 番目の「T」の間のリンにインターカレーター性蛍光色素が標識されている、また 3' 末端の水酸基はグリコール基で修飾されている)、

13% DMSO、

容量調整用蒸留水。

【0055】

(3) この反応液を 65℃ で 15 分間保温し、次に 41℃ で 5 分間保温した後、以下の組成の酵素液 4.2 μ l を添加した。

【0056】

酵素液の組成 (各濃度は最終反応液量 30 μ l における濃度)

1. 7% ソルビトール、

3 μ g 牛血清アルブミン、

142 U T7 RNA ポリメラーゼ (ギブコ社製)、

8 U AMV 逆転写酵素 (宝酒造 (株) 製)、

容量調整用蒸留水。

【0057】

(4) 引き続きチューブを直接測定可能な温度調節機能付き蛍光分光光度計を用い、41℃ で保温して、励起波長 470 nm、蛍光波長 510 nm で、反応溶液を経時的に測定した。

【0058】

酵素添加時の時刻を 0 分として、試料の蛍光増加比 (所定時刻の蛍光強度値 ÷ バックグラウンドの蛍光強度値) の経時変化を図 5 に示した。

【0059】

図 5 より、mRNA 200 ng 中に含まれる標的 RNA は約 6 分で検出された。更に、mRNA の量を 0.02 ng に減らしても、標的 RNA は約 11 分で検

出された。以上より、インターカレーター性蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより、迅速・高感度な測定が可能であることが示された。

【 0 0 6 0 】

実施例 6 感度

R T - P C R 及び T R C の感度を比較した。

実施例 2 で得られた m R N A 0 ~ 2 0 0 n g に対して、R T - P C R は実施例 3 に示す方法で 3 0 サイクル、T R C は実施例 4 に示す方法で 3 0 分間、それぞれ D N A 又は R N A の増幅を行った。

【 0 0 6 1 】

図 6 から明らかなように、0 . 0 0 2 n g の m R N A に対しては、R T - P C R では増幅されたことを検知できなかったが、T R C では増幅されたことを検知し得た。このことから、T R C が R T - P C R より 1 0 倍高い感度を達成し得ることが示された。

【 0 0 6 2 】

実施例 7 D N A 混入の影響

R T - P C R 及び T R C における、m R N A への D N A 混入の影響を調べた。

【 0 0 6 3 】

まず、実施例 1 に記載する方法で得られた細胞壁が溶解された G 1 細胞株から、市販のキット (G N o m e , B I O 1 0 1 I N c . 社製) を用いてゲノム D N A を調製した。上記 D N A 0 ~ 2 0 0 n g と実施例 2 で得られた m R N A 0 あるいは 2 0 0 n g に対して、R T - P C R は実施例 3 に示す方法で 3 0 サイクル、T R C は実施例 4 に示す方法で 3 0 分間行った。図 7 から明らかなように、R T - P C R では m R N A 非存在下でもゲノム D N A が 2 ~ 2 0 0 n g 存在すると増幅が見られた。一方、T R C では m R N A 非存在下ではゲノム D N A が 2 ~ 2 0 0 n g 存在しても、増幅は生じなかった。

【 0 0 6 4 】

次に、T R C における変性条件とゲノム D N A 由来の増幅との関係を調べた。上記ゲノム D N A 2 0 0 n g を用いて、実施例 5 に示す方法で、インターカレー

ター性蛍光色素で標識されたオリゴヌクレオチドプローブ（Y O - 3、配列番号 1 6）による測定を行った。ここで、シザープローブは 3 S（配列番号 9）の代わりに 1 S（配列番号 3）を、フォアードプライマーは 3 F（配列番号 7）の代わりに 1 F（配列番号 1）を、それぞれ用いた。シザープローブとフォアードプライマーを変えた理由は、増幅領域を非転写領域 1 5 9 塩基対を含む特定領域 1、2、3 から成る 5 4 0 塩基対の領域にし、RNA からの増幅を起こらないようにしたためである。また、反応液の酵素液添加前の処理条件を一定条件（6 5℃で 1 5 分間保温し、次に 4 1℃で 5 分間保温）の代わりに、下記の 3 条件とした。

【 0 0 6 5 】

- （1） 9 5℃で 1 5 分間保温し、次に 4 1℃で 5 分間保温
- （2） 6 5℃で 1 5 分間保温し、次に 4 1℃で 5 分間保温
- （3） 4 1℃で 5 分間保温

図 8 から明らかなように、蛍光増加比が 1. 2 を超えた時間は（1）では約 2 8 分、（2）では約 4 0 分であったのに対し、（3）では立ち上がりが見られなかった。

【 0 0 6 6 】

この結果は、変性条件を強くすることで DNA から増幅が起こりうることを示す。ここで、反応液の酵素液添加前の処理条件を（3）に示すような条件にすると、DNA からの増幅を抑えることには好都合である。しかしながら、RNA が 2 次構造をとることにより、RNA からの増幅が阻害されることが予想される。また、図 5 と図 8 を比較することにより、RNA からの増幅と DNA からの増幅では、蛍光増加比の経時変化が大きく異なり、両者の区別はきわめて容易である。

【 0 0 6 7 】

以上の結果を総合すると、本発明の実施においては、反応液の酵素液添加前の処理条件として、6 5℃で 1 5 分間保温し、次に 4 1℃で 5 分間保温する条件が適当であると考えられる。

【 0 0 6 8 】

【発明の効果】

本願発明で提供される方法を用いることにより、ゲノム全体中の遺伝子発現部位を明らかにすることが可能であるとともに、イントロンやエキソンの関係を含むゲノム構造が明らかにすることができるから、任意生物種で発現し得る全蛋白質の配列決定を容易にできる。

【 0 0 6 9 】

従って本願発明によれば、ポストゲノムを飛躍的に発展させることになり、生命現象を網羅的に理解することが可能になると考えられる。また、ヒトのポストゲノムにおいては、新規治療薬、診断薬の開発につながるとともに、オーダーメイド医療の展開にも大きく寄与することが期待できる。また、極限環境に生きる微生物から産業上有用な蛋白質を同定し、これを利用することにも大きく寄与する。

【 0 0 7 0 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Tosoh Corporation

<120> 新規ゲノム解析法

<130> PA210-0313

<160> 17

<210> 1

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 1 F

<400> 1

aattctaata cgactcacta tagggagatg ctccaagat tctggtggga ata 53

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 1 R

<400> 2

agtaagctaa taatgatgat 20

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 1 S

<400> 3

aagcatacaa tgtggagaca atgcataatc atcca 35

<210> 4

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> プライマー 2 F

<400> 4

aattctaata cgactcacta tagggagagc ttttgatttt aacgactttt aac 53

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 2 R

<400> 5

tgtagtggtg actggagcag 20

<210> 6

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 2 S

<400> 6

aaagcttgtc aattggaacc agtcgcaatt atgaa 35

<210> 7

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 3 F

<400> 7

aattctaata cgactcacta tagggagaga agctgtcatc ggttactcag att 53

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 3 R

<400> 8

cctcttctcg agagataccc 20

<210> 9

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 3 S

<400> 9

gcttcagccg gaatttgtgc cgtttcatct tctgt

35

<210> 10

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 4 F

<400> 10

aattctaata cgactcacta tagggagatt ccggaagagc cccctcagca atg

53

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 4 R

<400> 11

ggactctctgg gaatactggc

20

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 4 S

<400> 12

ccctccggga ctgctaactg gcaggagaac ttctg

35

<210> 13

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 5 F

<400> 13

aattctaata cgactcacta tagggagaga gggagacagc tctttctaca tag

53

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 5 R

<400> 14

ggggtttctg gccacggcag

20

<210> 15

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> プライマー 5 S

<400> 15

ccctccggga ctgctaactg gcaggagaac ttctg

35

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Y O - 3

<400> 16

cttctttagc agcaatgctg

20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> A Y O - 3

<400> 20

cagcattgct gctaaagaag

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、特定領域 1 ～ 5 の各塩基配列と、プライマー 1 F、プライマー 1 R、プライマー 1 S、プライマー 2 F、プライマー 2 R、プライマー 2 S、プライマー 3 F、プライマー 3 R、プライマー 3 S、プライマー 4 F、プライマー 4 R、プライマー 4 S、プライマー 5 F、プライマー 5 R、プライマー 5 S が相補結合する位置の関係を示す。

【図 2】

図 2 は、特定領域 1 ～ 5 の非転写領域と転写領域を示す。

【図 3】

図 3 は、実施例 3 に示す方法で特定領域 1 ～ 5 に対するプライマーを用いて、200 ng の mRNA に対して RT-PCR を 30 サイクル行っったときの、電気泳動のパターンを示す。

【図 4】

図 4 は、実施例 4 に示す方法で特定領域 1 ～ 5 に対するのプライマーを用いて、200 ng の mRNA に対して TRC を 10 分間、20 分間、及び 30 分間行っったときの、それぞれの電気泳動のパターンを示す。

【図 5】

図 5 は、実施例 5 に示す方法で特定領域 3 に対するプライマーを用いて、0 ～ 200 ng の mRNA に対して TRC を行っったときの、反応時間と RNA の生成とともに増大する蛍光増加比のグラフである。

【図 6】

図 6 は、実施例 6 に示す方法で特定領域 3 に対するプライマーを用いて、0 ～ 200 ng の mRNA に対して RT-PCR を 30 サイクル、あるいは TRC を

3 0 分間行ったときの、それぞれの電気泳動のパターンを示す。

【図 7】

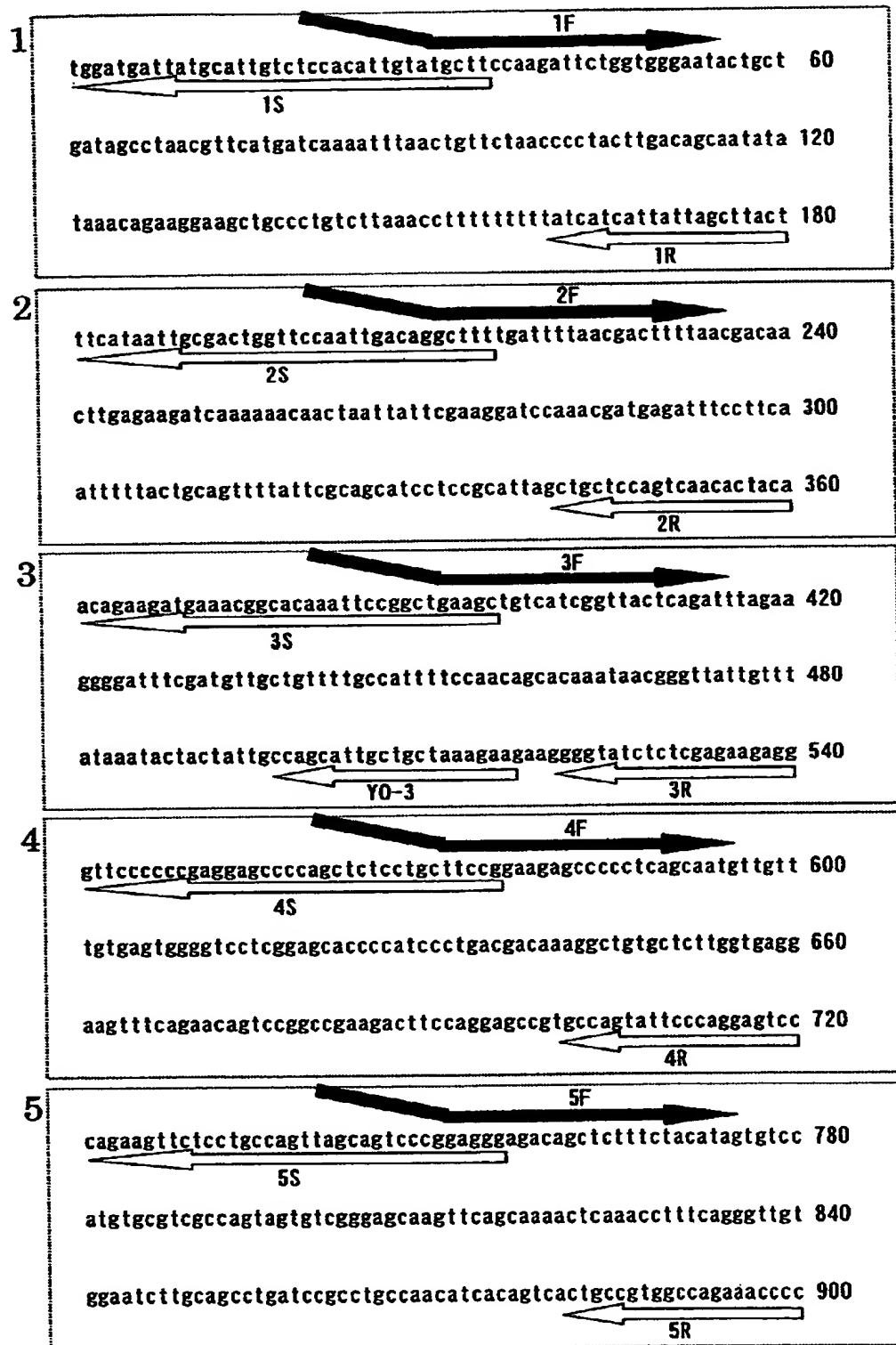
図 7 は、実施例 7 に示す方法で特定領域 3 に対するプライマーを用いて、0 あ
るいは 2 n g の mRNA 及び 0 ~ 2 0 0 n g のゲノム DNA に対して R T - P C
R を 3 0 サイクル、あるいは T R C を 3 0 分間行ったときの、それぞれの電気泳
動のパターンを示す。

【図 8】

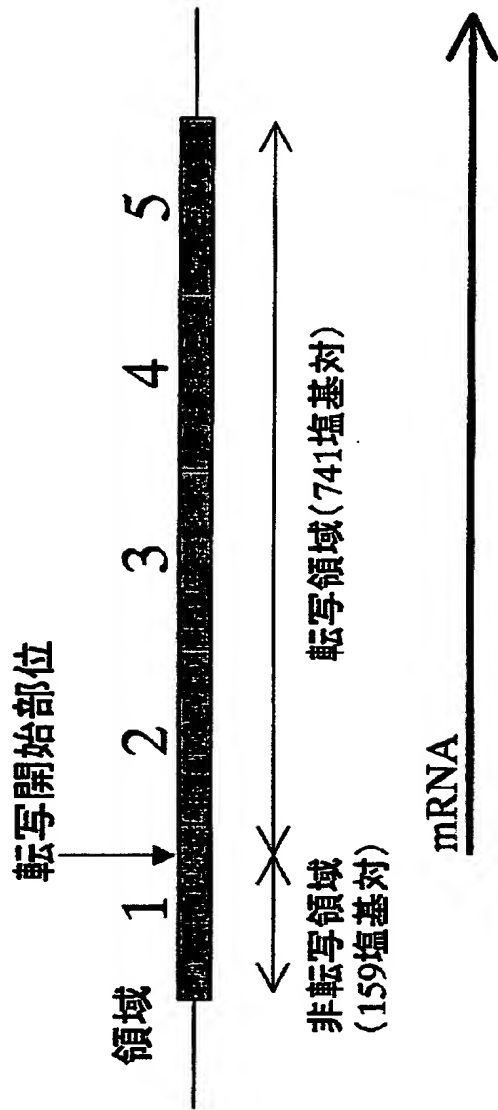
図 8 は、実施例 7 に示す方法で特定領域 1、2、3 から成る領域に対するプラ
イマーを用いて、2 0 0 n g のゲノム DNA に対して T R C を行ったときの、反
応時間と R N A の生成とともに増大する蛍光増加比のグラフである。

【書類名】図面

【図 1】



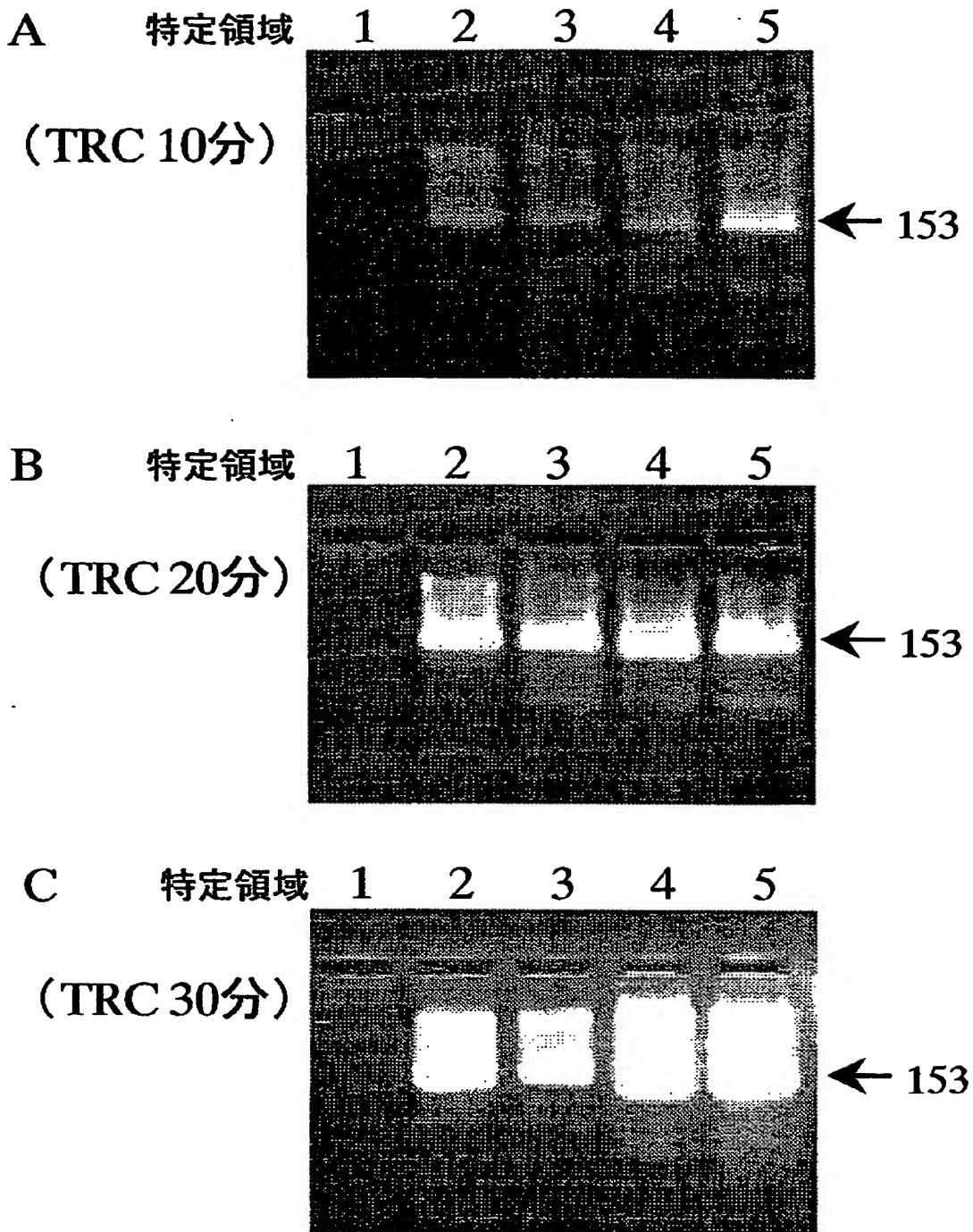
【図2】



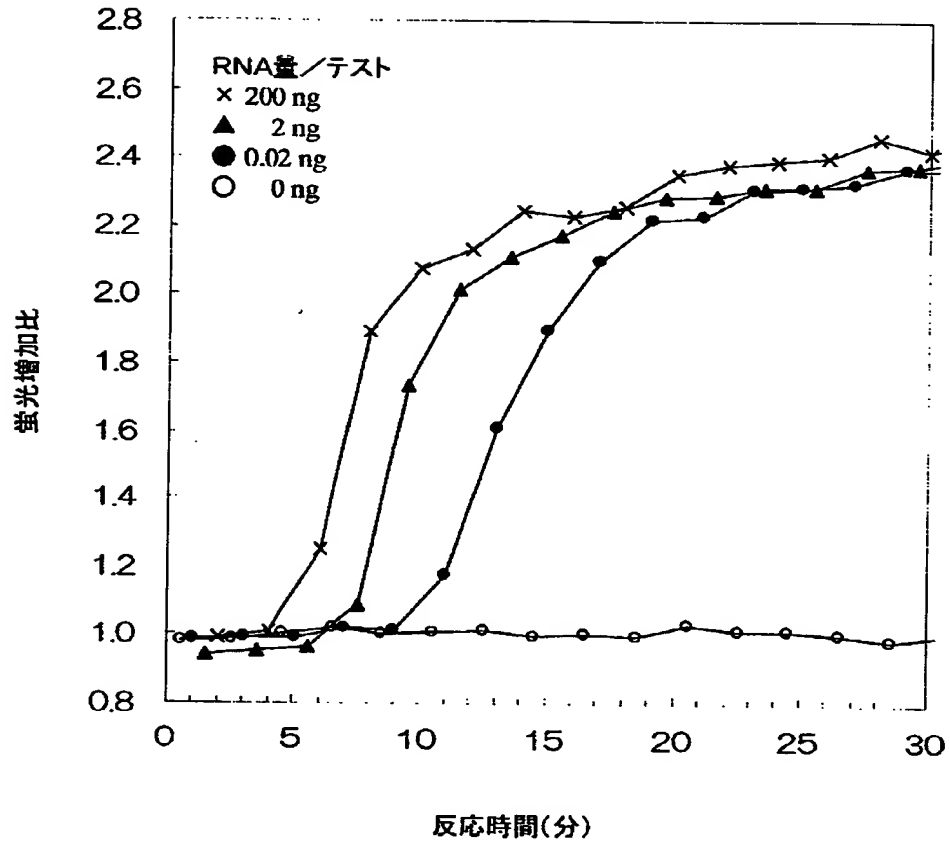
【図 3】



【図 4】



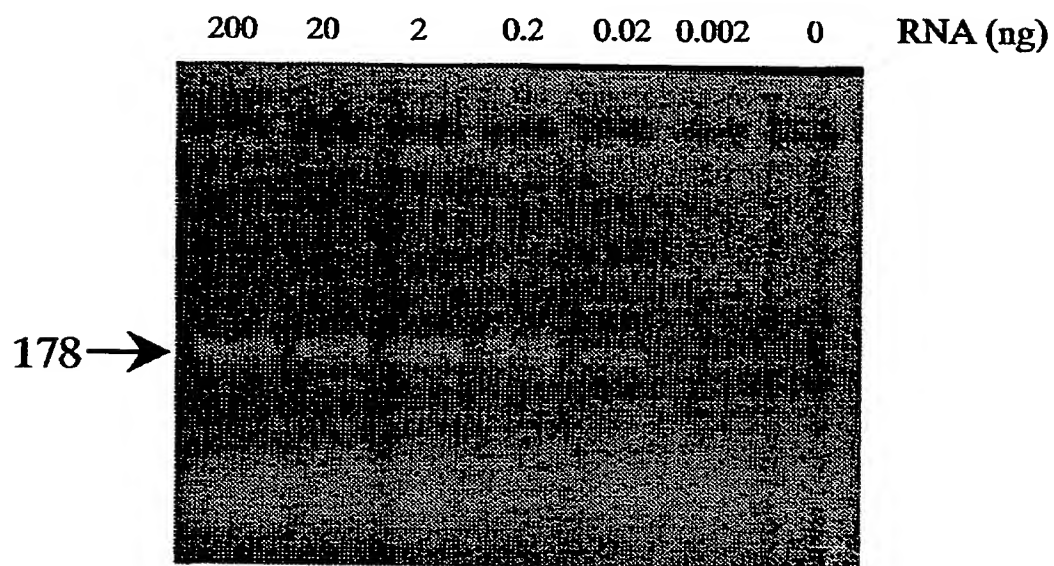
【図5】



【図 6】

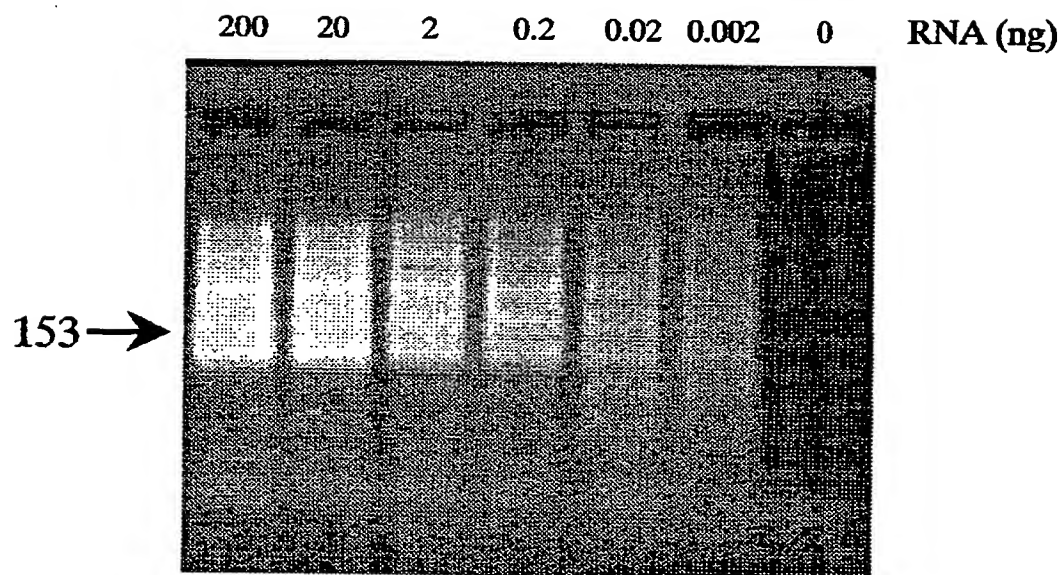
A

(RT-PCR 30サイクル、特定領域3)

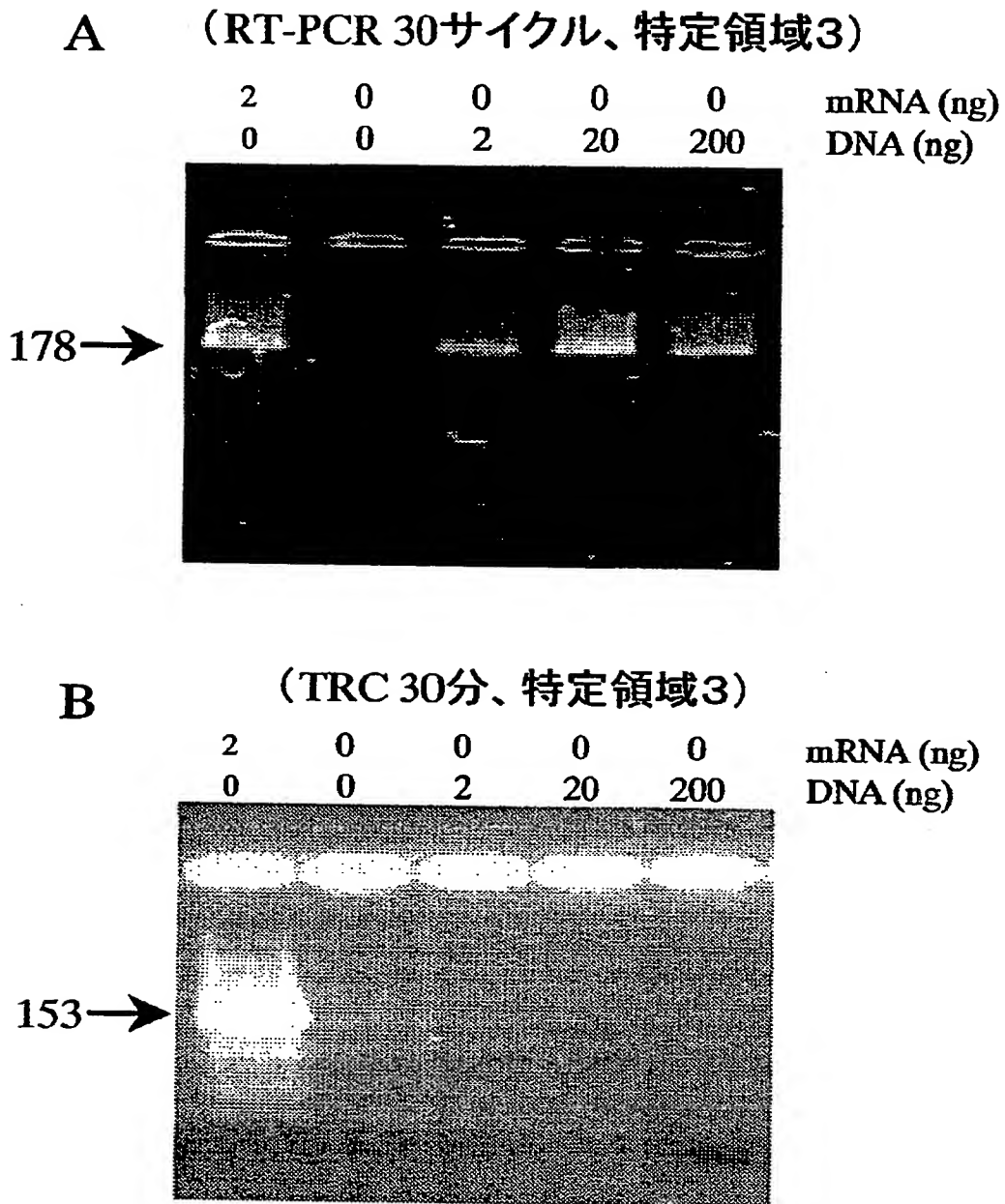


B

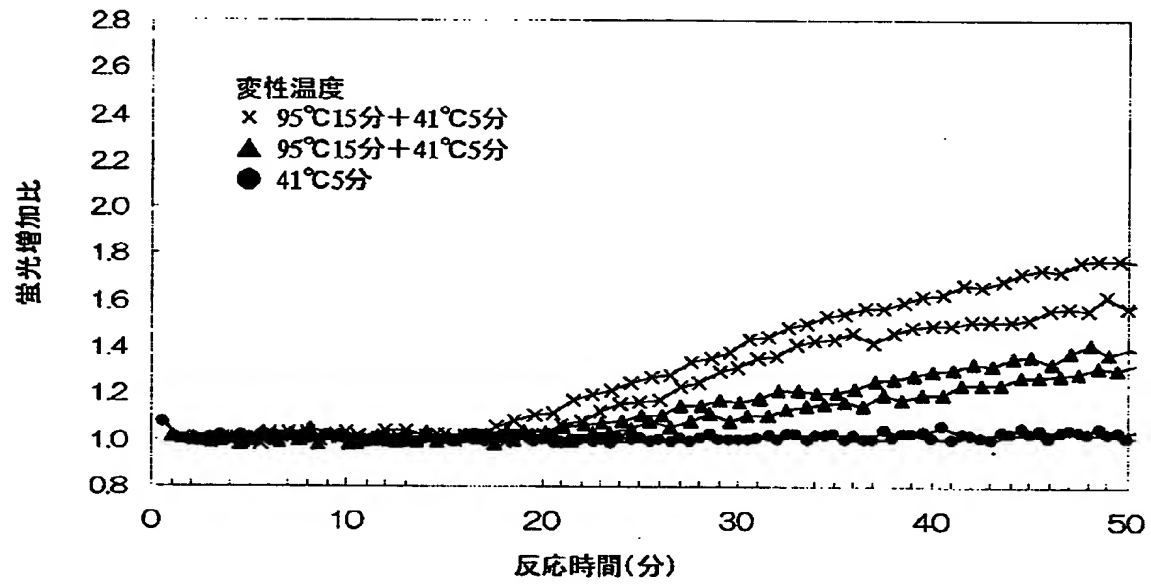
(TRC 30分、特定領域3)



【図 7】



【図8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規なトランスクリプトーム解析法を提供するとともに、かかる方法によって見出される遺伝子や該遺伝子がコードする蛋白質を提供する。

【解決手段】 任意生物種のゲノム中に存在する、連続した任意のDNA配列であって、塩基配列は既知であるが遺伝子発現部位であるか否か不明であるDNA配列（特定領域）について、前記生物種由来のRNA中に該領域の塩基配列に対応する塩基配列が存在するか否かを検出することにより、該特定領域が遺伝子発現部位であるか否かを決定する方法、そして該方法を繰り返し行うことによる、ゲノム上の任意の領域又はゲノム全体を対象とする遺伝子発現部位決定法。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003300]

1. 変更年月日 1990年12月 2日
[変更理由] 住所変更
住 所 山口県新南陽市開成町4560番地
氏 名 東ソー株式会社